

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



O microbioma na doença inflamatória intestinal: presente e futuro

Gonçalo Cortes Raposo Coutinho

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2017

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



O microbioma na doença inflamatória intestinal: presente e futuro

Gonçalo Cortes Raposo Coutinho

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentadas à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Orientador: Professora Doutora Maria Henriques Ribeiro

2017

Resumo

A doença inflamatória intestinal, onde se incluem a doença de Crohn e a colite ulcerosa, é uma doença crónica caracterizada por uma resposta imunológica exacerbada associada a uma marcada disbiose.

É uma doença que tem visto a sua incidência aumentar na população ao longo do tempo, sendo que as maiores incidências são reportadas nos países ocidentais. Crê-se que a doença inflamatória intestinal esteja relacionada a uma crescente industrialização e com a adoção de hábitos do Ocidente.

O microbioma tem um papel central na patogénese da doença inflamatória intestinal e este é induzido por uma componente genética e por diversos fatores ambientais, como a dieta, a medicação, a idade e a higiene. Estes fatores influenciam a composição e as funções do microbioma de formas e intensidades distintas.

As funções do microbioma do doente estão afetadas pela marcada disbiose, destacando-se as funções de barreira, imunológicas e metabólicas.

Várias pesquisas têm sido realizadas no âmbito de tratamentos moduladores da microbiota intestinal, como os prebióticos, os probióticos, o transplante de microbiota fecal, intervenções na dieta e antibióticos. Embora se tenham obtido resultados favoráveis, os estudos realizados apresentam algumas limitações e os resultados têm sido contraditórios.

Em virtude da complexidade da doença inflamatória intestinal, as medidas a tomar nas futuras intervenções serão em torno da identificação do papel do microbioma na patogénese; da possibilidade da composição microbiana predizer o risco da doença inflamatória intestinal e da capacidade da flora luminal antever a resposta à terapia. Para além disso, é indispensável a toma de medidas para melhorar a qualidade dos estudos através de uma posição multifacetada, holística e padronizada.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal; Microbioma; Doença de Crohn; Colite ulcerosa; Disbiose

Abstract

Inflammatory bowel disease, including Crohn's disease and ulcerative colitis, is a chronic disease characterized by an exacerbated immune response associated with marked dysbiosis.

It is a disease that has seen its incidence increase in the population over time, with the highest incidence being reported in Western countries. Inflammatory bowel disease is believed to be related to increasing industrialization and the adoption of Western habits.

The microbiome plays a central role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and this is induced by a genetic component and by various environmental factors, such as diet, medication, age and hygiene. These factors influence the composition and functions of the microbiome by different mechanisms and intensities.

Patient's microbiome functions are affected by the marked dysbiosis, highlighting the barrier, immunological and metabolic functions.

Several researches have been carried out on modulatory treatments of the intestinal microbiota, such as prebiotics, probiotics, fecal microbiota transplantation, dietary interventions and antibiotics. Although favorable results were obtained, the studies carried out presented some limitations and the results have been contradictory.

Due to the complexity of the inflammatory bowel disease, the measures to be taken in future interventions will be around identifying the role of the microbiome in the pathogenesis; the possibility of microbial composition predicting the risk of inflammatory bowel disease and the ability of the luminal flora to anticipate the response to therapy. In addition, it is essential to take measures to improve the quality of studies through a multifaceted, holistic and standardized approach.

Keywords: Inflammatory bowel disease; Microbiome; Crohn's disease; Ulcerative colitis; Dysbiosis

Índice

Resumo.....	3
Abstract	4
Índice.....	5
Acrónimos/Siglas.....	6
1. Introdução	8
2. Objetivo	9
3. Materiais e Métodos	9
4. Composição e diversidade da microbiota intestinal	10
5. Fatores que afetam o microbioma	10
5.1 Dieta	10
5.2 Genética	12
5.3 Medicação.....	13
5.4 Idade	15
5.5 Higiene	16
6. O Microbioma Intestinal: Impacto e Implicações	17
6.1 Metabolismo	17
6.2 Imunologia.....	19
6.3 Função de Barreira	21
6.4 Disbiose	23
7. Tratamento relacionado com a Microbiota	27
7.1 Probióticos	27
7.2 Prebióticos	28
7.3 Dieta	30
7.4 Transplante de microbiota fecal	31
7.5 Antibioterapia	32
8. Perspetivas futuras	34
9. Discussão.....	37
10. Conclusões	39
11. Referências bibliográficas.....	40

Acrónimos/Siglas

AHR - Recetor aril hidrocarboneto

AIEC – *E. coli* aderente invasiva

ATG16L1 - Proteína 16 *like* 1 relacionada com a autofagia

CD - Doença de Crohn

CDI – Infecção por *Clostridium difficile*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EEN - Nutrição entérica exclusiva

FMT – Transplante de microbiota fecal

FOS - Fructo-oligossacáridos

GBF - Alimento germinado de cevada

IBD – Doença inflamatória intestinal

IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase

IL - Interleucina

IRGM - GTPase M relacionada com a imunidade

NF-κB - Fator nuclear κB

NOD2 - Proteína 2 de domínio de oligomerização de nucleótidos

Reg3γ – *Regenerating islet-derived protein 3 gamma*

RNA - Ácido ribonucleico

SCD - Dieta de hidratos de carbonos específicos

SCFA – Ácidos gordos de cadeia curta

STAT1 - Transdutor do sinal e ativador da transcrição 1

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UC - Colite ulcerosa

1. Introdução

A doença inflamatória intestinal (IBD) é uma doença crónica caracterizada por uma resposta inflamatória exacerbada, levando à destruição do trato gastrointestinal. Esta doença está associada a uma morbilidade significativa. (1)

A etiologia exata das IBDs ainda é desconhecida, no entanto grandes evidências apontam para o papel central do microbioma na patogénese da IBD. É aceite mundialmente que a IBD deve-se a alterações na interação entre a microbiota intestinal e o sistema imunitário. (1)

O microbioma é o conjunto de micro-organismos e do material genético com estes relacionados. O microbioma é influenciado por vários fatores nomeadamente genéticos e ambientais.

As maiores incidências das IBDs têm sido reportadas na Europa Ocidental, na Austrália e na América do Norte. A IBD tem vindo a revelar um aumento considerável em países que reportavam raros casos, como na América do Sul e na Ásia. Crê-se que a IBD esteja relacionada com a industrialização e com a difusão de hábitos tipicamente ocidentais. A incidência da IBD nos países europeus, em 2010, variava entre 0,9 e 24 pessoas por 100000 habitantes com mais de 15 anos de idade. Em Portugal, no mesmo estudo, a incidência de IBD era de 11 casos por 100000 habitantes. A incidência da IBD na pediatria tem aumentado a um ritmo alarmante tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. (2) (3)

A IBD é largamente definida por duas doenças inflamatórias crónicas, a doença de Crohn (CD) e a colite ulcerosa (UC). A CD é caracterizada por uma inflamação que se estende ao longo de todo o trato intestinal e de uma forma mais profunda na parede da mucosa intestinal do que a UC e que manifesta abscessos e fístulas. Já a UC está restrita às camadas superficiais do cólon. Tanto a CD como a UC mostram alterações evidentes na composição da microbiota intestinal comparativamente à flora intestinal de um indivíduo saudável.(4)(5)

Os doentes com IBD são caracterizados por uma reduzida diversidade microbiana e espécies comensais, bem como um aumento de patobiontes, realidade denominada de disbiose, comprometendo, esta, a habilidade do microbioma de se adaptar e responder a

alterações impostas por fatores ambientais. Nesta situação, várias funções do microbioma (metabólicas, imunológicas, função barreira, entre outros) ficam comprometidas, agravando o estado do doente. Por este motivo, muitos estudos têm sido realizados na área do microbioma. (6)

Das variadas investigações acerca do microbioma intestinal incluem-se pesquisas na área da composição, da modulação e fatores que influenciam as funções do microbioma. Não obstante, devido à complexidade das IBDs, os estudos realizados apresentam algumas limitações. Estas análises têm o intuito de melhor conhecer este tema de molde a serem encontradas formas de diagnóstico mais eficazes, de tratamento e, possivelmente, encontrar uma cura. Porém, resultados obtidos nos diversos estudos realizados, demonstram o quanto é amplo o domínio ainda por conhecer.(6)

2. Objetivo

Esta monografia teve como objetivo caracterizar as alterações experimentadas e o papel do microbioma na IBD. A melhor compreensão desta relação pode abrir portas a inovações no âmbito do diagnóstico e tratamento dos doentes no futuro.

3. Materiais e Métodos

Para a realização desta monografia, foi realizada uma pesquisa bibliográfica em vários motores de busca como o GoogleScholar, o PubMed, Nature, GenomeBiology, GenomeMedical, e BioMed Central. Os termos utilizados na pesquisa foram “inflammatory bowel disease”, “microbiome”, “Crohn’s disease”, “ulcerative colitis” e “dysbiosis”. Deu-se preferência à inclusão de publicações posteriores a 2012. De modo a esclarecer informações incluídas nos artigos selecionados, valeu-se da consulta de algumas referências bibliográficas nestes descritas, sendo que algumas são anteriores a 2012.

4. Composição e diversidade da microbiota intestinal

O trato intestinal apresenta uma grande variedade de funções incluídas no genoma das bactérias presentes no dito, sendo que este conjunto prefaz mais de cem vezes o do ser humano. Com isto, podemos concluir que estes micro-organismos coexistem no hospedeiro em grande número e interagem entre si de uma forma bastante complexa. (7)

O trato intestinal apresenta uma grande variedade de micro-organismos, sendo composta por bactérias, fungos, parasitas e vírus. A maioria dos seres vivos incluídos no trato intestinal são bactérias e cerca de 90% pertencem a dois filos: o *Firmicutes* (64%) e o *Bacteroidetes* (23%). O filo *Firmicutes* é o que apresenta maior diversidade e abundância; e é essencialmente composto (95%) por membros da classe *Clostridia*. Um número considerável de bactérias pertencentes a este filo são produtoras de butirato e estas incluem-se nos *clusters* IV, XIV e XVI de *Clostridia*. Os géneros dominantes são o dos *Bacteroides*, *Faecalibacterium* e *Bifidobacterium* e estes podem apresentar uma abundância relativa variável de indivíduo para indivíduo. (5)(8)(9)

Os filos menos representados são o *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrumicrobia*. Estes encontram-se na maioria das pessoas, no entanto poderá haver alterações nas proporções e nas espécies existentes. (8)

Minoritariamente, encontram-se micro-organismos pertencentes ao domínio *Archaea*, caracterizado pela espécie *Methanobrevibacter smithii*, leveduras e alguns protistas. (8)

Com a contínua análise dos estratos taxonómicos mais específicos, como a espécie e a estirpe, pode-se concluir que cada indivíduo é anfitrião de um perfil bacteriano exclusivo. (7)

5. Fatores que afetam o microbioma

5.1 Dieta

A dieta é um fator que influencia decisivamente a composição da microbiota e dos metabolitos que existem no trato intestinal, tendo sido frequentemente relacionado com um aumento da incidência da IBD em indivíduos que têm uma alimentação tipicamente

ocidental, caracterizada por um elevado teor de gordura e proteína e baixa fibra (fruta e vegetais). Um estudo comparativo foi realizado com crianças europeias e com crianças de áreas rurais de África e demonstrou que as crianças africanas, que têm dietas ricas em vegetais e fruta apresentam uma microbiota intestinal enriquecida em *Bacteroidetes* (com predominância dos géneros *Prevotella* e *Xylanibacter*) e manifestavam uma diminuição em *Firmicutes*, em comparação com as crianças da Europa. (1) (10) (11)

Noutro estudo, comparou-se o microbioma de populações de áreas metropolitanas dos EUA, comunidades rurais do Malawi e ameríndios venezuelanos. Verificou-se que o microbioma norte americano foi reforçado em genes bacterianos relacionados à degradação da glutamina (presente em microbiomas de mamíferos carnívoros), no catabolismo de açúcares simples e substitutos de açúcar e outros aminoácidos. Em contrapartida, os microbiomas ameríndio e do Malawi viram-se intensificados com glutamato sintase (frequentemente vista nos mamíferos herbívoros) e em alfa amilase, que auxilia na degradação do amido. (1)(12)

Ambos os estudos mostram a capacidade adaptativa da flora intestinal face a exposições dietéticas a longo prazo, porém desconhece-se se essas adaptações são próprias de modificações dietéticas específicas, assim como não se sabe a intensidade necessária dessas alterações para modificar a composição do microbioma de forma permanente. (1)

De forma a analisar o impacto das dietas a curto prazo, foi realizado um estudo durante 10 dias, utilizando duas populações em que cada indivíduo recebeu uma dieta rica em gordura/pobre em fibra ou pobre em gordura/rica em fibra. Decorridas 24 horas, já era possível identificar alterações na composição do microbioma. Porém, a magnitude das mudanças não era significativa para causar alterações expressivas nos grupos de bactérias mais predominantes. No final do estudo, o microbioma de cada pessoa ainda mantinha mais semelhanças com o microbioma no início do estudo do que com o dos outros sujeitos, indicando que as diferenças interpessoais na composição bacteriana intestinal são resistentes a intervenções de curto prazo. (1)(13)

Para estudar o impacto das dietas a curto prazo no microbioma em maior detalhe, foi estudado o efeito de dietas constituídas inteiramente por produtos baseados em produtos animais (leite, ovos, queijos) ou plantas (grãos, legumes, frutas) durante 5 dias. Ao fim de 24h, constatou-se que a dieta baseada em produtos animais induziu alterações na composição da microbiota, sendo que, 2 dias após o término do estudo, a composição

retomou ao estado inicial. A dieta com base em animais manifestou uma maior abundância de organismos tolerantes à bÍlis (*Alistipes*, *Bilophila wadsworthia* e *Bacteroides*) com nÍveis diminutos de *Firmicutes* degradantes de polissacÁridos vegetais (*Roseburia*, *Eubacterium rectale* e *Ruminococcus bromii*). Ainda associado à dieta com base em animais, foram detetados aumentos especÍficos em *Bilophila wadsworthia*, tendo esta sido associada à capacidade de indução de IBD em ratinhos, mostrando uma conexão entre gorduras alimentares, ácidos biliares e o crescimento de micro-organismos com capacidade de participar na IBD. No final do estudo, verificou-se que a dieta baseada em produtos animais induziu alterações na abundância de 22 *clusters*, ao passo que a dieta baseada em plantas somente afetou a abundância de três. (1)(14)

As dietas carentes em fibra são sistematicamente ligadas à IBD, provavelmente devido à diminuição da produção de ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) por bactÉrias comensais, nomeadamente *Clostridium clusters* IV e IVXa, cuja fonte de energia preferencial é a fibra. O butirato é um SCFA, e este é crítico para a saúde do cólon, pois funciona como fonte de energia preferencial das células do cólon. (4)

5.2 Genética

As taxas de concordância entre gémeos monozigóticos são apenas de 15-20% para a UC e menos de 50% para a CD, assinalando que, apesar dos genes conferirem maior suscetibilidade à IBD, não são, no entanto suficientes para o desenvolvimento da doença. Os gémeos e os membros da família de doentes com IBD usualmente apresentam parâmetros intestinais anormais e microbioma alterados sem desenvolver IBD, inculindo à genética uma predisposição nas pessoas de disfunção intestinal, todavia, são necessários outros fatores ambientais para despoletar o início da doença. (4)

Num estudo reparou-se que não haviam diferenças significantes na diversidade microbiana fecal entre os gémeos monozigóticos e dizigóticos com a respetiva mãe, no entanto houve uma tendência para uma maior semelhança nos gémeos monozigóticos comparativamente com os dizigóticos. (6)(15)(16)

É sabido há muito que a composição genética do hospedeiro também afeta a sua vulnerabilidade para a IBD. Conquanto alguns fatores de risco genéticos sejam

exclusivos para a CD ou para a UC, similarmente existe um conjunto de genes comuns entre as duas condições. (6)

Embora a CD e a UC estejam ambas associadas a regiões genômicas que incluem produtos de genes incluídos no tráfego de leucócitos, estão evidenciadas padrões de associação que são distintos entre a CD e a UC. As associações preponderantes da CD abarcam a proteína 2 de domínio de oligomerização de nucleótidos (NOD2) e genes que controlam a autofagia. Num estudo, foi determinado, que os homozigóticos e os compostos heterozigóticos da mutação NOD2 possuem risco aumentado em 20 vezes para a CD. A NOD2 identifica o peptidoglicano bacteriano (muramyl dipeptídeo) e é fundamental para a produção de vários péptidos antimicrobianos intestinais que oferecem imunidade protetora ao hospedeiro, conferindo informação genética para um recetor intracelular que por sua vez reconhece um componente das paredes celulares bacterianas. (6)(17) As mutações da NOD2 conduzem a uma perda de função, o que aumenta a suscetibilidade a CD. A NOD2 também é conhecido por interagir com a proteína 16 *like* 1 relacionada com a autofagia (ATG16L1) ou GTPase M relacionada com a imunidade (IRGM) para a depuração autofágica de seres patogénicos intracelulares em todo o corpo. Assim, quando a NOD2 sofre mutações, a ATG16L1 ou a IRGM sozinhas não conseguem induzir resposta autofágica, que, por sua vez, pode agravar a disbiose microbiana.(4)(6)

Muitos doentes diagnosticados com IBD precoce apresentam mutações que afetam o recetor interleucina-10 (IL-10). (6)

Uma mutação no recetor de IL-23 mostrou oferecer uma proteção entre duas a três vezes superior contra o desenvolvimento de IBD.(4)

5.3 Medicação

Vários estudos já evidenciaram que os medicamentos estão associados à crescente incidência de IBD através de um efeito na microbiota ou na função de barreira. (4)

É conhecido que os antibióticos causam mudanças na composição microbiana e o seu uso na infância e na vida adulta foi relacionado com o risco aumentado de IBD. A

utilização de tetraciclina no tratamento do acne tem sido associada ao aumento do risco de CD. (4)

A terapia com antibióticos, ainda que fundamental perante uma infecção, pode causar efeitos drásticos no microbiota intestinal, como a eliminação da diversidade e a desregulação do sistema imunitário do hospedeiro, conduzindo a uma maior suscetibilidade à doença. O espectro de ação do antibiótico, a dosagem, a duração do tratamento, a via pela qual é administrado e, também, as características relativas ao fármaco e ao organismo (farmacocinética e farmacodinâmica), influem na forma como os antibióticos alteram a microbiota intestinal. (18) Os antibióticos utilizados no tratamento de doenças são em regra de largo espectro, afetando, não apenas, as bactérias responsáveis pela infecção, como também outros micro-organismos. Os micro-organismos que resistem podem depender de produtos resultantes do metabolismo secundário efetuado pelas bactérias afetadas, levando à perda de nutrientes e/ou acumulação de produtos tóxicos, interferindo com o normal equilíbrio destes micro-organismos, podendo, ainda, conduzir à sua eliminação. (19)

Os antibióticos encontram-se entre os fatores mais fortes associados à redução da diversidade ecológica. Muitos *clusters* individuais foram fortemente reduzidos ou quase extintos após a administração de antibióticos, incluindo *Collinsella*, *Dorea*, *Butyricicoccus*, *Subdoligranulum* e *Acetivibrio*. Esses géneros são predominantemente da ordem *Clostridiales*, bactérias Gram-positivas e anaeróbicas que são alvo dos antibióticos vulgarmente usados na IBD, como a ciprofloxacina e o metronidazol. (20)

Dados recentes demonstram que o uso de antibióticos relevantes para a CD, como ciclos repetidos de ciprofloxacina, uma combinação de ciprofloxacina e metronidazol, ou a combinação de amoxicilina, metronidazol e bismuto resultam em mudanças de longo prazo na composição microbiana e na diminuição da diversidade. Um estudo mostrou que os efeitos de um tratamento de curta duração de antibióticos de largo espectro (clindamicina) para cobertura anaeróbica poderiam perdurar até 2 anos, sem melhoria da diversidade de *Bacteroides*. A principal questão que se coloca ao uso de antibióticos de largo espectro é a transmissão de genes que conferem características de resistência por via horizontal. As espécies bacterianas são capazes de transferir informação genética mutada por diferentes espécies através de mecanismos como conjugação, transdução fágica, transformação natural, transposões e integrinas. Também já foi demonstrado que

a microbiota intestinal humana tem 25 vezes mais probabilidade de ter uma transferência de genes horizontal do que em diversos ambientes semelhantes não humanos, resultando no desenvolvimento de múltiplas resistências contra os antibióticos. (15)(18)(21)

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroides estimulam a ruptura da barreira intestinal, alteram a composição da microbiota e foram associados a um risco aumentado de desenvolvimento de IBD e recaída clínica. Os contraceptivos orais têm efeitos sobre a microbiota vaginal, também podem afetar a microbiota gastrointestinal e estão associados de forma variável (segundo a dose de estrogénios, sexo e idade) a um risco aumentado de desenvolver a CD. Existem outros medicamentos associados a alterações da microbiota (inibidores da bomba de prótons) e a melhorias na integridade das *tight junctions* (bloqueadores β). (4)

5.4 Idade

A maioria dos diagnósticos para IBD ocorre em adultos jovens (20-30 anos), porém pode manifestar-se em qualquer idade. De forma alarmante, os estudos epidemiológicos demonstraram que a incidência de IBD em crianças está a aumentar. Esses dados são perturbadores, porque o microbioma é conhecido por mudar extraordinariamente ao longo da vida. O microbioma de um recém-nascido é muito menos complexo do que o de um adulto. O tipo de parto (natural, cesariana), tipo de alimentação (leite materno, leite de fórmula), o tempo de gestação e a componente genética, são os fatores decisivos para a abundância e diversidade microbianas iniciais. O microbioma estabiliza até se tornar num jovem adulto, no qual o ambiente tem uma influência maior na sua composição. (6)

Alterações taxonómicas específicas de cada idade foram identificadas no microbioma intestinal. A microbiota dos bebés nascidos vaginalmente é inicialmente colonizada por micro-organismos da vagina materna, predominando espécies dos géneros *Lactobacillus* e *Prevotella*. Caso seja por cesariana, o intestino do bebé é colonizado por organismo da pele da mãe, sendo principalmente populado por *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*. Em lactentes alimentados com fórmula, *Enterococcus*,

Enterobacteria, *Bacteroides*, *Clostridia* e outros *Streptococcus* anaeróbicos dominam a flora intestinal; enquanto que, em lactentes amamentados, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* predominam no trato intestinal. Nas crianças pré-termo, a microbiota intestinal é usualmente colonizada mais lentamente e depende muito do tipo de alimentação. Estas crianças têm uma maior variabilidade interindividual e menor diversidade que a das crianças de termo, apresentando um grande risco de desenvolver patologias devido à imaturidade imunológica, comparativamente com as crianças termo. (6)(21)

As bactérias colonizadoras precoces do intestino neonatal são principalmente aeróbios, sendo que esta torna-se cada vez mais complexa e estável, convergindo para um padrão comum em que predominam anaeróbios, como os *Firmicutes*. A microbiota mantém-se em constante evolução até à idade adulta, havendo um aumento gradual de *Bacteroides*, uma diminuição de *Lactobacillus* por volta dos 5 anos de idade e diminuição de *Bifidobacterium* no fim da adolescência. (9) Nos jovens adultos encontra-se um predomínio do filo *Firmicutes* comparativamente aos filós *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. À medida que a idade avança, tende-se a observar uma prevalência superior de *Bacteroidetes*. Porém, o número de espécies e diversidade, dentro deste filo, diminui. Esta alteração na microbiota pode dever-se ao aumento da necessidade de digerir a alimentação, com o objetivo de compensar a diminuição da funcionalidade do sistema digestivo. (22)

A partir de vários estudos foi possível fazer uma análise da variação da microbiota humana através do gradiente bacteriano fecal ao longo da idade e concluiu-se que há uma transição de comunidades enriquecidas em *Bifidobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* e *Sperptococcaceae* na infância para comunidades enriquecidas em *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae* e *Ruminococcaceae* em adultos. (6)

5.5 Higiene

No mundo desenvolvido, a higiene, geralmente associada à melhoria do saneamento básico, é um fator ambiental que pode concorrer para o surgimento de doenças

autoimunes. Na base desta hipótese está a ideia de que os países desenvolvidos sujeitam-se a menos seres patogénicos (por exemplo, infeções virais, *Helicobacter pylori* e helmintas) em resultado de um maior e melhor asseio em comparação com os países em desenvolvimento. (23) A ausência de exposição a micro-organismos patogénicos ou simbiontes durante o desenvolvimento imunológico precoce na infância pode influenciar o desenvolvimento natural do sistema imunológico, alterando a predominância de subtipos de linfócitos T (T helper 1 para T helper 2) que potenciam respostas imunitárias agressivas e fenómenos autoimunes, incluindo a IBD. (4)(23)

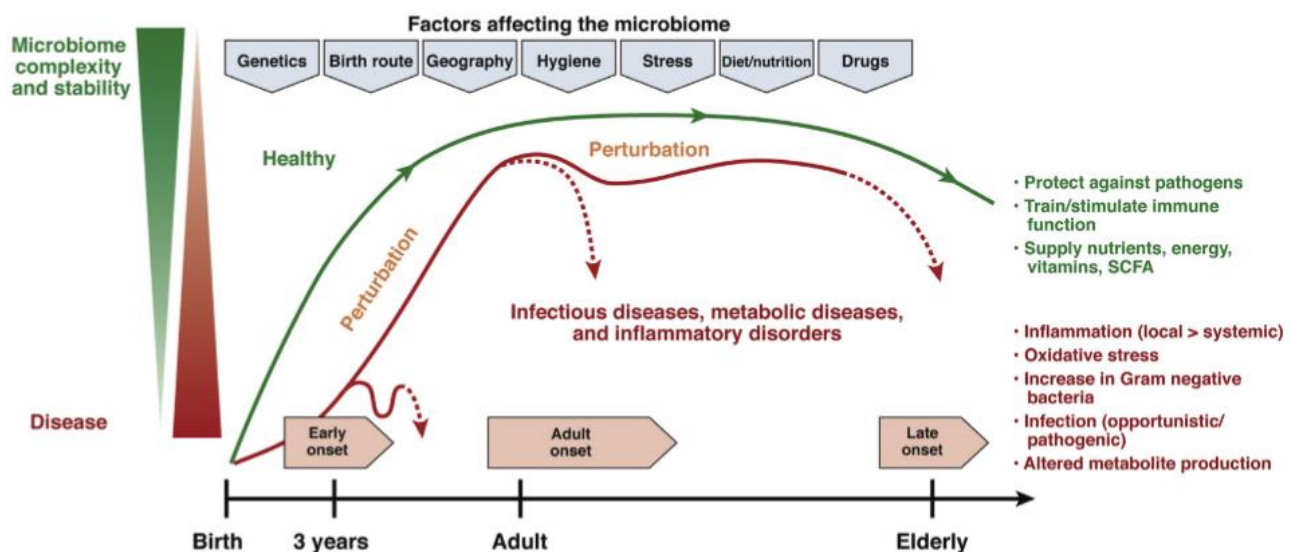


Figura 1 Fatores que afetam a estabilidade e a complexidade do microbioma intestinal na saúde e na doença ao longo do tempo (Adaptado de Kostic, et al. 2014)

6. O Microbioma Intestinal: Impacto e Implicações

6.1 Metabolismo

As funções metabólicas da microbiota intestinal influenciam fortemente o ambiente intestinal o que influi naturalmente na saúde do hospedeiro. As alterações na estrutura microbiana podem impulsionar instabilidade na produção de metabolitos que, por seu turno, podem estar ligadas à patogénese da IBD. Diversas bactérias, incluindo a *Faecalibacterium*, originam SCFAs, como acetato, propionato e butirato. (6)(24) Estes organismos são absorvidos no cólon, onde cada um desempenha uma função específica. O acetato é um substrato de importância considerável para a produção de butirato,

enquanto que o butirato é um substrato energético do metabolismo celular para as células epiteliais do cólon; nesta conformidade, as bactérias que produzem butirato têm uma função fundamental na integridade da barreira epitelial. (24) Num estudo foi detetada uma redução na quantidade de bactérias produtoras de butirato e uma redução dos níveis de acetato e propionato em amostras fecais de doentes com UC. (25) Um outro estudo verificou uma redução da produção de SCFA e butirato pelas comunidades do lúmen presentes em doentes com UC. A abundância dos produtores conhecidos de SCFA (os *clusters Clostridium* IV e XIVA, *F. prausnitzii* e *Roseburia spp.*) e os genes para a butiril-CoA: acetatos CoA transferase (responsável pela produção de butirato) também estavam reduzidos. (6)

A composição do microbioma e os metabolitos produzidos pelas bactérias são fortemente influenciados pela dieta. Os estilos alimentares de longo e curto prazo têm sido associados a enterótipos microbianos. Por exemplo, as dietas ricas em proteínas e gorduras animais acarretam o aumento de espécies *Bacteroides*, ao passo que as dietas ricas em hidratos de carbono aumentam as de *Prevotella*. Os incrementos nas dietas baseadas em animais resultam numa maior abundância de bactérias com tolerância à biliar, como *Bacteroidetes* (*Alistipes* e *Bacteroides*) e *Proteobacterias* (*Bilophila*) e uma diminuição na abundância de *Firmicutes* (*Roseburia*, *Eubacterium rectale* e *Ruminococcus bromii*). (6) O consumo de certas gorduras saturadas eleva os níveis de ácido taurocólico e, por sua vez, aumenta o enxofre orgânico na biliar. (26) As dietas de origem animal aumentam a produção de ácido biliar, o que vai afetar a composição microbiana ao criar condições para a expansão de micro-organismos patogénicos, como *Bilophila wadsworthia* redutora de sulfitos, que aumenta a disbiose. (6)

O metabolismo do triptofano poderá estar envolvido na etiopatogénese da IBD. O triptofano fornece um metabolito intermediário essencial para a ação do recetor aril hidrocarboneto (AHR) na supressão da resposta imune nas células dendríticas. O AHR induz a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) para catabolizar o triptofano, resultando a quinurenina. Existindo uma carência no AHR, ocorrerá uma diminuição de quinurenina e posteriormente dar-se-á uma produção incrementada de linfócitos T helper 17 pró-inflamatórios. (6)(26)

A IL-27 está implicada na manutenção da proteção da barreira epitelial contra bactérias normais do intestino e está elevada durante a IBD. A IL-27 ativa vários membros da

família de tradutores de sinal e ativadores da transcrição (STAT) e depende de STAT1 para ativar a IDO. Num estudo, verificaram que a IDO induzida por IL-27, através da depleção local de triptofano, inibiu o crescimento das bactérias intestinais, levando à disbiose. Curiosamente, a redução do triptofano está envolvida na inflamação em todo o corpo; as deficiências na triptofano hidroxilase-1 (que converte o triptofano na serotonina) são conhecidas pela sua aptidão para aumentar a inflamação neural. (6)(26)

6.2 Imunologia

De forma a explicar o papel do sistema imunológico na IBD é preciso distinguir as funções da imunidade inata das da imunidade adaptativa. O sistema imunitário é responsável por moderar o processo inflamatório que incide nos doentes com IBD. Por isso, é essencial conhecer os mecanismos associados à inflamação crónica intestinal, a fim de conduzir à descoberta de novos alvos terapêuticos. (27)

A imunidade inata é a primeira barreira de defesa contra seres estranhos. No geral, os micro-organismos invasores são detetados e destruídos num curto espaço de tempo, pois não é necessário recorrer a mecanismos específicos, como a expansão clonal de linfócitos antígeno-específicos, dessa forma a resposta é inespecífica e não apresenta memória imunológica. As células dendríticas e os macrófagos são as principais células que regulam a imunidade inata. (28) Segundo um estudo, a IBD apresenta a resposta imunológica inata contra a microbiota intestinal como característica principal na patogénese da doença. (29)

Nas pessoas saudáveis, os macrófagos são instruídos pelo ambiente mucoso para expressarem um fenótipo não inflamatório. Por outro lado, os indivíduos com IBD que apresentam tecidos afetados, os macrófagos da mucosa apresentam um fenótipo inflamatório. (28)

Os macrófagos expressam um marcador monocítico CD14 e produzem diversas citocinas pró-inflamatórias: IL-1-alfa, IL-1-beta e TNF- α . Na CD, os macrófagos pró-inflamatórios CD14+ colaboram para a formação de interferão-gama pelos linfócitos T no local e, como estes estão em maior número, produzem mais IL-23 e TNF-alfa comparativamente com doentes com UC e indivíduos saudáveis. (28)

As células dendríticas intestinais também apresentam a sua função condicionada pelo ambiente em que se inserem e elas podem agir em defesa, induzir tolerância ou mediar a inflamação no indivíduo. Estas estão ativadas na IBD e sintetizam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, sendo a IL-12 e a IL-6 exemplos, pois a sua expressão de recetores microbianos está mais elevada. (28)

A imunidade adaptativa é intercedida por dois tipos de linfócitos: os linfócitos B e os linfócitos T. Esta é caracterizada por ser uma resposta específica a antígenos e desenvolve-se de uma forma mais lenta, comparativamente com a imunidade inata. Esta também é caracterizada por ter memória imunológica. (27)

Na IBD, a síntese de anticorpos pelos linfócitos B encontra-se aumentada tanto no sangue como na mucosa intestinal. Foi visto que os doentes com UC e com CD têm diferentes padrões de produção de várias classes de anticorpos, principalmente de IgG1. Na CD, os níveis de IgG1, IgG2 e IgG3 apresentaram-se elevados proporcionalmente, comparativamente com as células controlo, na UC observou-se um incremento desproporcional da secreção de IgG1. (30)

Para além dos anticorpos mediados pelos linfócitos B, há os que são condicionados pelos subgrupos de linfócitos T CD4+. Na UC e na CD, as células T CD4+ estão ativas na lâmina própria e secretam citocinas pró-inflamatórias. Alguns linfócitos T CD4+, como as células Th1, Th2 e Th17, são de carácter pró-inflamatório enquanto as células Treg (CD4+ e CD25+) são anti-inflamatórias. O comensal, *Bacteriodes fragilis*, produz antígenos, como o polissacárido A, que induzem a conversão de linfócitos T CD4+ em células T reguladoras de FoxP3, que por sua vez produzem citocinas IL-10 que amenizam a resposta pró-inflamatória da Th17. (6) Podemos explicar que os níveis reduzidos de *F. prausnitzii* na IBD são alcançados pelas propriedades anti-inflamatórias desta espécie que operam impedindo parcialmente a ativação de NF-κB e a produção de IL-8 em modelos animais de IBD e, desta forma, melhoram a disbiose analisada em modelos de colite induzidos quimicamente. Para além disso, As espécies de *Lactobacillus casei* / *paracasei* concebem uma protease bacteriana, a lactocepina, que deteriora seletivamente a quimiocina IP-10 de recrutamento de linfócitos. A IP-10 é uma quimiocina pró-inflamatória está envolvida na IBD; desta feita, a sua deterioração por lactocepina pode elucidar parcialmente os efeitos benéficos de *Lactobacillus spp.* (6)(28)

Alguns mecanismos inflamatórios podem estar comprometidos devido a variações em certos genes, comprometendo a resposta imunológica em doentes com IBD. Variações no gene NOD2 implicam uma menor capacidade de reconhecimento e processamento de produtos bacterianos, levando a uma resposta ineficaz. Alterações nos genes da ATG16L1 e IRGM de autofagia têm sido associadas com frequência à CD, implicando uma menor capacidade de processamento de produtos de degradação celular, dando a uma eliminação deficiente de produtos pró-inflamatórios. (6)(17)(28)

6.3 Função de Barreira

A função da mucosa intestinal é a de estabelecer uma barreira que separa o sistema imune inato e adaptativo da microbiota, dos alimentos e de outros conteúdos luminais. Na sua constituição encontram-se diversas camadas de muco, internas e externas com hidrofobicidade superficial forte, embebidas em fatores antimicrobianos e revestindo células epiteliais intestinais subjacentes conectadas por *tight junctions*. (4)(6) Vários tipos de células compõem esta camada celular, compreendendo as células caliciformes e Paneth, as quais produzem mucina e péptidos antimicrobianos, como defensinas, catelicidinas e lisozimas. Para além disso, as células caliciformes e as células Paneth facultam funções de barreira importantes que controlam a tolerância imunológica. Consequentemente, a descontinuação da integridade da barreira epitelial costuma ser implicada na patogénese da IBD por intermédio de uma vasta gama de mecanismos específicos que englobam vias estruturais, metabólicas e de imunidade inata. As deficiências da barreira compreendem o aumento da permeabilidade do muco à água e várias moléculas que podem provocar resposta imune como causa ou consequência da IBD. (6)(28)(31)

O incremento da permeabilidade do muco pode ocorrer devido à composição modificada dos componentes do muco secretados por células caliciformes, compreendendo a mucina diminuída, a diminuição dos produtos de glicosilação ou, ainda, em resultado de uma redução dos fatores antimicrobianos libertados no muco por células epiteliais (Reg3 γ), por células de Paneth (defensinas) e por células plasmáticas (IgA). Na UC, as camadas de muco são mais finas ou até ausentes, assim como, as células caliciformes, que são responsáveis pela produção de muco, estão esgotadas, ao

contrário daquilo que se passa na CD. Certos membros da microbiota associada à IBD utilizam o muco como uma fonte de energia e regulam a sua produção. Desta forma podemos dizer que há evidências de que as alterações no muco podem ser entendidas tanto como causa ou efeito da disbiose. (4)(28)

As *tight junctions* também mostram maior permeabilidade na IBD. A integridade das *tight junctions* pode ser influenciada por fatores ambientais e genéticos. A descontinuidade da integridade das *tight junctions* possibilita que os micro-organismos se transfiram para além da superfície da mucosa, ganhando acesso à submucosa imunologicamente ativa e ao espaço sistêmico. A endotoxemia está bem comprovada no IBD e outros componentes microbianos como a flagelina (proteína estrutural do flagelo bacteriano), pílí (microfibrilas proteicas) e ácido lipoteicoico também devem ser responsáveis por estimular o sistema imunitário. (4)(28)

Por outro lado, existem diversas bactérias que produzem hemolisinas, que danificam as membranas celulares do hospedeiro. A hemolisina libertada por *Escherichia coli* aumenta as lesões iniciais na mucosa do cólon, o que, por seu turno, reduz a resistência elétrica transepitelial e aumenta a absorção macromolecular. No entanto, verificou-se que doentes com UC tinham níveis de hemolisina-alfa 10 vezes superior aos doentes com doentes com CD ou indivíduos saudáveis, sugerindo um papel de hemolisina-alfa na rutura da barreira epitelial, ressaltando novamente a importância de medir a capacidade metabólica da microbiota em vez de simplesmente sua composição. (6)(32)

A gelatinase, uma metaloproteinase produzida por *Enterococcus faecalis*, interrompe a barreira epitelial e aumenta a inflamação em ratinhos geneticamente suscetíveis a IBD. Alguns genes de virulência têm aparecido com mais frequência em isolados de *Enterococcus* de doentes com IBD, incluindo *gelE* que codifica para a gelatinase. (6)

Tal como acontece com a disbiose, é discutido se as alterações assinaladas na função de barreira são resultado ou a causa da IBD. (4)

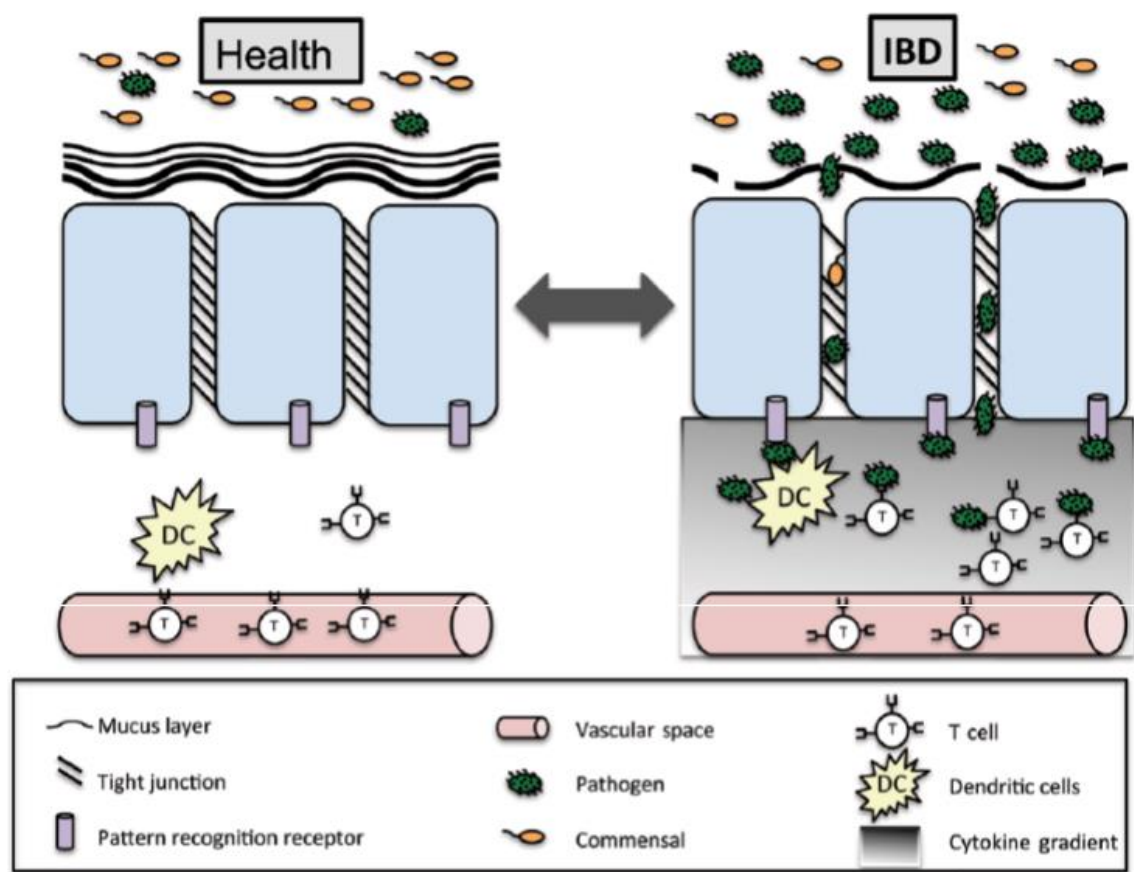


Figura 2 Os mecanismos patofisiológicos da IBD. A barreira mucosa de um indivíduo saudável mantém o conteúdo do lúmen separado do sistema imune. No caso da quebra da barreira, irá ocorrer uma resposta imune face à translocação de micro-organismos, agravando a disbiose e a função barreira. (Adaptado de Vindigni, et al. 2016)

6.4 Disbiose

A microbiota intestinal de doentes com IBD geralmente difere da dos indivíduos saudáveis. As mudanças na composição entre as duas populações caracterizam-se por uma perda de diversidade microbiana e de comensais benéficos, bem como o aumento de possíveis patobiontes. (6) Permanece em grande parte desconhecida se a gravidade da disbiose intestinal é a causa ou a resposta à doença. Embora certas bactérias oportunistas, como *Enterobacteriaceae*, tenham aumentado a abundância relativa nos doentes com IBD e em modelos animais de inflamação intestinal, na maioria dos casos, as conexões causais permanecem evasivas e a possibilidade de que as alterações na abundância das bactérias comensais intestinais desempenham um papel na patogénese

da IBD mantêm-se. As alterações na composição do microbioma são complexas, havendo vários resultados contraditórios para algumas bactérias. (6)

Os doentes com UC possuem maiores densidades bacterianas associadas a biópsias do que os doentes com CD. A redução de *Faecalibacterium* e *Bifidobacterium* bem como o aumento de *Bacterioides* foram encontrados em doentes com CD. Os níveis reduzidos de *F. prausnitzii* foram inversamente relacionados à gravidade da UC. Além disso, a redução de *F. prausnitzii* indicou um maior risco de recorrência de CD ileal pós-operatória. Além disso, caracterizando a microbiota associada à mucosa de doentes com CD revelou uma abundância reduzida de *F. prausnitzii* e abundância elevada de *Escherichia coli*. Uma redução consistente de *F. prausnitzii* foi observada em amostras fecais de doentes com UC durante remissão, particularmente aqueles com história de recidiva frequente, enquanto que a manutenção da remissão foi associada ao aumento de *F. prausnitzii*. No entanto, apesar dessas descobertas de níveis reduzidos de *F. prausnitzii*, foi detetado um aumento de *F. prausnitzii* no início da CD na pediatria, mas não na UC. Noutro estudo, comparando gémeos com CD, com vertente no cólon e no íleo, exibiram aumento e diminuição em *F. prausnitzii*, respetivamente. As diferenças entre esses estudos podem provavelmente ser atribuídas a diferenças no tipo de amostra (mucosa do cólon versus fezes) e duração da doença (início da doença versus IBD instalada). Novamente, essas comparações destacam a importância de uma metodologia de amostragem padronizada para minimizar os fatores de confusão e facilitar a comparabilidade entre os estudos. Os doentes com CD também mostraram uma menor abundância relativa de *Bacteroides uniformis* e maiores abundâncias relativas de *Bacteroides ovatus* e *Bacteriodes vulgatus*. Foram observadas reduzidas populações bacterianas nos grupos *Clostridium* dos clusters IV e XIVA em amostras fecais de doentes com CD e UC, respetivamente. No entanto, um outro estudo refere que os membros do grupo *Clostridium cluster IV* estão em números reduzidos tanto na CD quanto na UC. (5)(6)

Outra espécie dominante, *Roseburia hominis*, também parece ser reduzida significativamente em doentes com UC e está correlacionada de forma inversa à atividade e duração da UC. As abundâncias de *F. prausnitzii* e *R. hominis* equiparam-se, sugerindo que esses micro-organismos podem potencialmente definir a disbiose da UC e, portanto, podem ser usados para gerir o equilíbrio microbiano em doentes com UC pela administração de probióticos ou prebióticos. Curiosamente, essas populações

bacterianas não estão corretamente relacionadas com níveis elevados de SCFA, que são conhecidos por regularem a inflamação, o que novamente sugere que a análise da composição por si só, pode não ser suficiente para caracterizar a IBD. Um estudo sobre a microbiota fecal de doentes com UC identificou 8 *clusters* distintos, 7 dos quais distinguem doentes com UC a partir do único *cluster* individual saudável. Além disso, esses grupos consistem em várias bactérias não classificadas, que incluem *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroides* e *Lactobacillus*. No seu conjunto, essas bactérias parecem ser capazes de distinguir doentes com UC daqueles de indivíduos saudáveis e, portanto, poderão ser potenciais biomarcadores de IBD. (6)(33)

As bactérias patogénicas, como *Escherichia coli* (especialmente *E. coli* aderente invasiva (AIEC)), *Rhodococcus spp.*, *Shigella spp.* e *Stenotrophomonas maltophilia* são cada vez mais observadas em doentes com a IBD. A análise de amostras fecais de crianças com IBD revelou que *E. coli* foi positivamente e *Bacteroides* negativamente correlacionados com a CD, ao passo que os doentes com UC apresentaram o inverso. Também se observou que os doentes com IBD podem sofrer várias infeções associadas a micro-organismos patogénicos oportunistas; e, portanto, o aumento dos níveis dessas bactérias patogénicas pode ser devido às infeções secundárias não relacionadas à patogénese da IBD. Foi o que se observou em doentes com IBD que apresentaram um aumento do biofilme urogenital de *Gardnerella vaginalis*, um dos principais seres patogénicos na vaginose bacteriana. (6)

Entre todas as mudanças de composição do microbioma durante a IBD, é particularmente importante destacar a disbiose causada por patobiontes. Os patobiontes são distinguíveis dos micro-organismos patogénicos, pois só se tornam prejudiciais aos indivíduos predispostos quando um estímulo ambiental é desencadeado. *Escherichia coli*, como a AIEC, é um patobionte importante que pode desempenhar um papel no desenvolvimento da IBD. As estirpes de AIEC causam uma alteração patológica adaptativa que aumenta a resposta inflamatória intestinal. Outros patobiontes relevantes incluem o *Clostridium difficile*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Prevotellaceae*. No entanto, uma vez que a microbiota exibe um controlo importante sobre seres patobiontes e agentes patogénicos, podem ser aplicadas intervenções para prevenir o efeito etiológico dos patobiontes. Por exemplo, demonstrou-se que a molécula microbiana de polissacarídeo A (que é produzida por *Bacteroides fragilis*)

previne a IBD experimental induzida por *H. hepaticus* em modelos animais, provavelmente induzindo a produção de IL-10 e posterior supressão de colite. (6)

Da análise/comparação dos géneros existentes (*Akkermansia*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Escherichia-Shigella*, *Faecalibacterium*, *Klebsiella*, *Parabacteroides*, *Pseudomonas* e *Sporacetigenium*) nos vários locais anatómicos do trato intestinal (íleo, cego, cólon e reto), retira-se que estes se mantêm constantes à exceção dos géneros: *Escherichia* e *Shigella* na CD parecem estar numericamente mais elevados no cego e *Pseudomonas* na CD também parece ser numericamente mais elevado no reto. (5)

A partir da análise dos filos e géneros encontrados nos vários tecidos (íleo, cego, cólon ou reto) entre doenças dá para ver na tabela 1 que a abundância de *Bacteroidetes* varia significativamente entre os doentes com CD e UC e com o local anatómico das biópsias. A variação da representação proporcional de *Bacteroidetes* entre as doenças e tecidos distintos é mais clara no íleo e no cólon, seguido de tecido retal. A abundância proporcional de *Firmicutes* varia significativamente entre doenças no íleo e no cólon. Da mesma forma, as *Proteobacterias* tinham abundâncias desproporcionais entre tecido ileal, do cólon e retal. Não foram observadas variações significativas entre as doenças no cego. (5)

Tabela 1 Comparação ao nível do filo entre 3 grupos de doentes (CD, UC e Saudáveis) entre várias zonas do trato intestinal (Adaptado de Forbes, et al., 2016)

Abundância média (%)												
	CD				UC				SAUDÁVEIS			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>ACTINOBACTERIA</i>	1	1	1	1	2	1	1	1	n.d.	n.d.	1	0,5
<i>BACTEROIDETES</i>	53	41	52	50	16	20	24	22	62	75	62	59
<i>FIRMICUTES</i>	41	35	40	41	60	60	54	53	24	25	37	38,5
<i>FUSOBACTERIA</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2
<i>PROTEOBACTERIA</i>	n.d.	23	5	8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>NÃO CLASSIFICADOS</i>	5	n.d.	n.d.	n.d.	18	15	18	21	14	n.d.	n.d.	n.d.
<i>VERRUCOMICROBIA</i>	n.d.	n.d.	3	n.d.	4	4	3	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

(A) íleo; (B) cego; (C) cólon; (D) reto; (n.d.) não detetado

7. Tratamento relacionado com a Microbiota

7.1 Probióticos

A noção de probiótico, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura conjuntamente com a Organização Mundial de Saúde, foi considerada como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. (34)

É essencial destacar que os probióticos comportam diversos mecanismos de ação, tais como defesa face a bactérias patogénicas através da produção de compostos antimicrobianos, competição por nutrientes, redução do pH, capacidade de estimular o sistema imune e a função barreira. Importa que tenham igualmente certas particularidades que lhes possibilitam resistir à passagem pelo sistema digestivo (resistência às enzimas proteolíticas e não conjugação com os sais biliares) e, ainda, ter aptidão para aderirem ao epitélio para ulterior colonização. (1)(35)

Os probióticos mais frequentemente invocados pelos autores para o tratamento de IBD incluem *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *E. coli* Nissle 1917 e VSL#3 . É provável que o fator que mais contribuiu para a aceitação do uso de probióticos na IBD, tenha resultado

de uma combinação chamada VSL#3, composta por 4 estirpes de lactobacilos, 3 estirpes de bifidobactérias e 1 estirpe de *Streptococcus thermophilus*. Foi comprovada a eficácia de VSL#3 no tratamento de manutenção em doentes com UC com pouchite crónica/recidivante e o seu uso na prevenção primária de pouchite após cirurgia colorretal (parece moderar a inflamação intestinal). Outro probiótico, *E. coli* Nissle 1917, também demonstrou poder ser futuramente apto à utilização na manutenção da remissão para doentes com UC, podendo ser utilizado como opção para os doentes intolerantes às preparações de ácido 5-aminosalicílico. (1)

Ainda que estas descobertas clínicas sejam encorajadoras, a maior parte dos estudos em doentes com UC foi residual, tendo a sua concretização sofrido limitações metodológicas críticas que vieram a dificultar a obtenção de conclusões claras quanto ao uso de probióticos. Porém, alguns ensaios clínicos apoiam certas formulações de probióticos na UC. Em raros ensaios, *E. coli* 1917 Nissle teve um efeito análogo à mesalamina em baixa dose na manutenção da remissão em UC. Num estudo, verificou-se que a formulação VSL#3 combinada com terapia de esteroides e mesalamina mantiveram a remissão (92,8%) num ensaio de um ano em crianças com UC ativa. (1)(36)

Quanto à CD, a evidência disponível não oferece qualquer melhoria efetiva, e os probióticos não são indicados nem para indução nem para a manutenção da remissão da doença. Crê-se que a eficácia dos probióticos no tratamento da CD depende da estirpe bacteriana utilizada e que as hipóteses atuais não têm as espécies comensais intestinais protetoras como a *F. prausnitzii*. (36) Nas raras investigações sobre o efeito dos probióticos na flora fecal, levadas a cabo, concluiu-se que VSL#3 aumentou as concentrações de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus salivarius*. As concentrações incrementadas permaneceram estáveis durante o tratamento, mas volveram à linha de base 15 dias após a interrupção. (1)

7.2 Prebióticos

Os prebióticos são “ingredientes não digeríveis que beneficiam o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento ou atividade de um certo número de

bactérias”. Os prebióticos tratam-se de hidratos de carbono que não sofrem hidrólise nem são absorvidos pelo intestino, resistem à acidez gástrica e operam como substratos para os probióticos, alcançando-se desse modo, uma relação simbiótica, melhorando a continuidade de bactérias no intestino. Exemplos típicos são a fructo-oligossacáridos (FOS), a inulina, a lactulose e os galacto-oligossacáridos. (1)(35)

Esses hidratos de carbono são fermentados por bactérias anaeróbicas ao atingirem o cólon, produzindo SCFA e gás ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$). A diminuição subsequente no pH favorece o aumento das Bifidobacterias, Lactobacilos e *E. coli* não patogénica e, simultaneamente, diminui a *Bacteroidaceae*. Esta fermentação de hidratos de carbono também leva à produção de ácidos butíricos que provaram exercer ação anti-inflamatória. (1)

Ainda que as diretrizes relativas ao uso prebiótico na IBD permaneçam equívocas, existem estudos que demonstram a sua capacidade de alterar a microflora e proporcionar benefícios clínicos. A elevada capacidade de retenção de água do alimento germinado de cevada (GBF), por exemplo, ajudou a modular o teor de água das fezes, conduzindo à melhora dos sintomas na IBD. Por outro lado, numa investigação, descobriu-se que 4 semanas de GBF em doentes com UC originam melhorias clínicas e endoscópicas. A exacerbação da doença com a conclusão do GBF indicia que um tratamento prolongado ou crónico pode ser necessário para que esta terapia seja efetiva. Relativamente ao seu efeito no microbioma humano, a administração de GBF conduziu a uma maior abundância luminal de *Bifidobacterium* e *Eubacterium*, bem como níveis aumentados de butirato, originando atenuação da inflamação. Outros estudos demonstram que a combinação de FOS e inulina, que adiciona o efeito benéfico na modulação da microflora e a da elevação dos níveis de butirato também foi relatada na atenuação da inflamação em ratos transgénicos HLA-B27. O complemento entre o prebiótico combinado (inulina/FOS) com o probiótico *Bifidobacterium longum* em doentes com CD ativa melhorou os achados clínicos e histológicos e diminuiu transitoriamente as concentrações de $\text{TNF-}\alpha$ na mucosa. (36) (1)

Ainda que esses achados sejam promissores no geral, os seus efeitos na modificação da microbiota intestinal podem variar entre indivíduos saudáveis e doentes com IBD, não havendo dados concretos a favor ou contra o uso de prebióticos no tratamento de IBD, e eles continuam a ser usados como um suplemento à terapia convencional e não como

substituto. Por outro lado, os dados sobre o efeito que eles têm sobre a microflora permanecem limitados. (1)(6)

7.3 Dieta

Diversas dietas foram propostas para prevenir e tratar a IBD. Dado o forte benefício da ingestão de fibra, recomenda-se uma dieta equilibrada e saudável com frutas e vegetais. Uma vez que uma dieta rica em proteínas associada a um excesso de carne e álcool demonstrou taxas aumentadas de recaída na UC, evitar esses alimentos poderá ser benéfico. (4)

Alguns estudos têm sido realizados em doentes com IBD para averiguar as intervenções específicas na dieta no microbioma. Alguns estudos revelam que o uso de nutrição entérica exclusiva (EEN) com formulações elementares (ou oligoméricas) ou não elementares (ou poliméricas), (1) têm a mesma eficácia que o uso de corticosteroides na indução da remissão da CD na pediatria (com uma taxa de eficácia de 80%), e apresenta um melhor perfil de efeitos secundários. Crê-se que seja mais eficaz em doentes recentemente diagnosticados com CD do que em doentes recorrentes. (37) A eficácia da EEN em doentes adultos com CD parece ser menor talvez devido a uma má adesão ou a uma exposição prévia a terapias imunossupressoras. (4) Estas dietas também são bastante eficazes na manutenção da remissão. Mesmo com composições diferentes, as várias dietas utilizadas na EEN apresentaram grandes semelhanças na eficácia. (38)

O modo de ação de EEN na indução da remissão ainda é desconhecido, porém acha-se que altera a microbiota intestinal. A EEN utilizada isoladamente conseguiu induzir a remissão, e mostrou haver uma grande modificação na microflora fecal. Num estudo foi feita a comparação da microbiota fecal de indivíduos saudáveis com a de crianças com CD a fazerem EEN. No final do estudo, verificou-se que a EEN induziu remissão na maioria das crianças e que a composição bacteriana fecal sofre grandes alterações. Numa investigação, analisaram as mudanças específicas induzidas na microbiota de doentes com CD que receberam uma dieta elementar. No início do estudo, conferiu-se que os níveis das espécies de *Bifidobacteria* e *Clostridium* era significativamente menor nos doentes com CD em comparação com indivíduos saudáveis e a proporção de

Enterococcus na microbiota total era superior. No fim do estudo, verificou-se que os níveis médios de *Bacteroides fragilis* patogénica nos doentes com CD, bactéria esta muitas vezes associada a lesões inflamatórias em doentes com CD, diminui significativamente, no entanto a diversidade de espécies manteve-se. (1)(39)(40) A nutrição entérica parcial, uma dieta em que os alimentos de mesa são adicionados à EEN, também mostrou ser eficaz na CD em adultos e na pediatria. (4)

O programa da dieta de hidratos de carbonos específicos (SCD), uma dieta que é composta principalmente por monossacáridos, proteínas, gordura, vegetais com uma razão elevada de amilose para amilopectina, fruta e nozes, foi mostrada em pequenas séries de casos para ser eficaz para induzir e manter a remissão na CD e na UC. Acha-se que o SCD altera o microbioma ou a função de barreira através de diferenças nos macronutrientes ou na remoção de determinadas exposições alimentares. (4)(41)

7.4 Transplante de microbiota fecal

Os antibióticos de largo espectro são usuais como uma modalidade terapêutica para erradicar bactérias potencialmente patogénicas em doentes com IBD. A falta de especificidade do antibiótico pode causar danos nas populações de bactérias comensais benéficas. Este desequilíbrio na microflora do intestino contribui para o desenvolvimento de infeção por *Clostridium difficile* (CDI), um dos efeitos adversos comuns resultantes do uso de antibióticos. A CDI recorrente é normalmente tratada pela descontinuação do antibiótico administrado e dando cursos prolongados de metronidazol, vancomicina oral ou fidaxomicina. Porém, a alta taxa de recorrência de CDI impõe um regime terapêutico alternativo, e o FMT revelou-se uma abordagem atrativa. O FMT, que compreende a infusão de fezes de um dador saudável no doente, tem o intuito de restaurar a interrupção da microbiota intestinal e comprovou elevadas taxas de sucesso em doentes com CDI recorrente (>90% taxa de cura). (1) Esta terapêutica é considerada mais eficaz para o tratamento desta infeção, quando comparada com o tratamento com antibióticos como a vancomicina. (42)

É possível que caso o FMT seja bem sucedido na reposição da microflora alterada nos doentes com CDI, será, do mesmo modo, eficaz na restauração da disbiose encontrada

na IBD. Nos raros estudos disponíveis, observou-se que, contrariamente aos doentes com CDI que em regra requerem apenas uma infusão de fezes, os doentes com IBD carecem de infusões em série para se obter algum impacto clínico. Por outro lado, em virtude do número limitado de estudos FMT na IBD, o efeito a longo prazo desta opção terapêutica no microbioma humano reclama maior estudo. (1)

Num estudo que observou o efeito da FMT em IBD, doentes com UC moderada a grave refratária quanto a terapia padrão, foram seguidos durante 3 meses após o FMT. A composição da microflora fecal foi monitorizada em vários momentos ao longo de 12 semanas. O estudo mostrou um aumento geral da diversidade após o transplante, assim como uma alteração na microbiota para se assemelhar à da do dador, nos primeiros 3 dias do FMT. Porém, para a maioria desses doentes, esta mudança reverteu aos níveis iniciais ao fim de 1-4 semanas após o transplante. Num dos doentes, no entanto, a microbiota manteve-se semelhante à do dador às 12 semanas e várias bactérias do dador (incluindo *F. prausnitzii*, *Rosebura faecis* e *Bacteroides ovatus*) podiam ser encontradas neste doente ao longo do estudo. (1)

Num ensaio prospetivo, estudou-se o efeito de FMT em doentes pediátricos com UC. Estes foram tratados com quatro enemas de FMT por dia durante cinco dias consecutivos, sendo que a maioria dos doentes teve uma resposta clínica quatro semanas depois. Não foi utilizado nenhum grupo de controlo. (36)

Outro estudo prospetivo de FMT realizou-se com doentes com CD refratária. Estes foram tratados com um FMT diretamente no jejuno durante a endoscopia. Um ano depois, metade dos doentes estava em remissão clínica. Não foi utilizado um grupo controlo. (36)

Embora os resultados pareçam promissores para o uso do FMT para tratar as IBDs, vários estudos obtiveram resultados controversos. A indução de remissão da IBD aparenta ser possível para alguns doentes, no entanto estes resultados não são universais, sendo necessários mais estudos. (36)

7.5 Antibioterapia

Se admitirmos que a IBD é o resultado de uma resposta exacerbada a antígenos bacterianos por parte do sistema imunitário, o tratamento com antibióticos poderá trazer vantagens. (1) Estes já são utilizados há muito tempo como terapia primária da CD, bem como para situações onde existe uma elevada proliferação bacteriana, casos de sépsis e preparações pré-operatórias de IBD. Infelizmente, o uso de antibióticos é mal suportado por grandes ensaios aleatorizados e controlados por placebo. Vários estudos defendem o papel dos antibióticos no tratamento da CD e da UC. (36) De tal modo, os antibióticos de largo espectro continuam a ser utilizados como tratamento em doentes com IBD (particularmente aqueles com CD complicada) e verificou-se que estes conseguiram induzir mudanças rápidas na microbiota em vários estudos. A duração das alterações induzidas ainda é desconhecida, diferindo entre os vários estudos. (1)

Num estudo, foi analisado o efeito de um tratamento de curta duração do metronidazol e ciprofloxacina naqueles com IBD. A combinação destes dois antibióticos, que foi administrada ao longo de um curso de 1 dia ou 7-14 dias de tratamento, mostrou um decréscimo rápido das bactérias das mucosas no primeiro dia da terapia com antibióticos. A cessação dos antibióticos, no entanto, foi relacionada a um efeito de *rebound* drástico, com um grande aumento das concentrações de bactérias mucosas ao fim de 1 semana do término da intervenção. Esse aumento de concentração ainda foi significativo às 18 semanas, mas retornou aos níveis iniciais ao fim de 6 meses. (1) Embora a utilização de ciprofloxacina e metronidazol tenha mostrado alguns resultados promissores no tratamento dos doentes com CD, o mesmo não se verifica nos vários estudos realizados com doentes com UC. Um estudo realizado durante 6 meses mostrou que a ciprofloxacina trazia benefícios como terapia adjuvante em doentes com UC tratados com corticosteroides e mesalamina. (1)(36)(43)(44)

Um grupo de investigadores avaliou a possibilidade da indução de alterações a longo prazo nas bactérias da mucosa de doentes com UC com um ciclo curto de amoxicilina, tetraciclina e metronidazol. O estudo durou 2 semanas e verificou-se que os doentes manifestaram alterações no microbioma que perdurou pelo menos 3 meses em comparação com o placebo. No entanto, não se verificaram diferenças nos sintomas clínicos ou nos scores endoscópicos. (1) Um estudo realizado no Japão, utilizando os mesmos antibióticos e duração do ciclo referidos no estudo anterior, conseguiu obter maiores taxas de melhoria de sintomas, de remissão, de paragem da toma de corticosteroides em doentes com UC ativa durante um ano, comparativamente a

placebo. Os perfis de microbiota das biópsias da mucosa da maioria dos doentes tratados com antibióticos mostraram melhoria em três meses, com diminuição das concentrações de *Fusobacterium varium*, em comparação com indivíduos tratados com placebo. (36)

A maioria dos estudos que envolvem o uso de antibióticos indica que os ciclos curtos de antibioterapia levam a mudanças passageiras no microbioma. Devido ao aparecimento de efeitos adversos associados a ciclos longos de antibióticos, poucos estudos foram realizados sobre o efeito que estes podem ter no doente. A intolerância gastrointestinal, a resistência a antibióticos e o aumento da incidência de CDI são alguns dos problemas mais conhecidos. Por esse motivo, a rifaximina, um antimicrobiano intestinal, devido à sua absorção intestinal mínima (menos de 1% da dose administrada por via oral) é praticamente livre de efeitos colaterais, tornou-se uma alternativa atrativa para doentes com IBD. Este tem uma atividade de largo espectro contra a maior parte dos agentes patogénicos entéricos, incluindo espécies anaeróbicas aeróbicas, Gram-positivas e Gram-negativas. A rifaximina mostrou superioridade na indução de remissão comparativamente com placebo em doentes com CD, como também mostrou bons resultados na manutenção da remissão nos doentes que obtiveram remissão com o tratamento padrão de prednisona. (1)

De modo a estudar o impacto da rifaximina sobre a microflora intestinal, uma investigação debruçou-se na avaliação da microbiota fecal em 4 doentes com CD. Este estudo demonstrou que a composição geral da microbiota intestinal continuou a mesma; ainda assim, a rifaximina aumentou as concentrações específicas de bactérias benéficas para o hospedeiro, como *Bifidobacterium*, *Atopobium* e *F. prausnitzii*. (1)

8. Perspetivas futuras

Com a continua evolução da compreensão do microbioma humano relacionado com a IBD, surgirão progressos consideráveis quanto à capacidade de identificar com precisão os micro-organismos que despoletam a inflamação ou evitam os seus efeitos. A título de exemplo, alguns micro-organismos, como *F. prausnitzii*, revelaram ter efeitos anti-inflamatórios *in vitro* em células epiteliais intestinais e *in vivo* em ratinhos modelo com

colite. Estes elementos podem levar à utilização de comensais anti-inflamatórios ou os seus metabolitos para tratamento da IBD. Conta-se com o conhecimento adquirido ao longo dos anos sobre a microflora única de cada indivíduo e os principais micro-organismos que contribuem para a patogénese da doença vão sendo cada vez mais evidentes, lograremos desenvolver uma abordagem mais individualizada e dirigida contra micro-organismos patológicos específicos. (1) É de todo adequado afirmar que, numa primeira fase, a perspetiva futura será a da abordagem personalizada.

Investigações futuras maiores subordinadas a uma sequenciação genética, podem discernir ainda mais as influências relacionadas com os fatores genéticos e ambientais na IBD. Análises em modelos animais podem efetuar estudos mecanísticos da influência de genes relacionados com a IBD em populações microbianas complexas e usar ratinhos gnotobióticos colonizados com certos grupos de espécies bacterianas significativas para a IBD tendo em vista a identificação dos efeitos característicos de genes na composição, expressão genética e função bacterianas. Da mesma sorte, as consequências de diversos integrantes da dieta ocidental na composição, expressão genética e função das bactérias comensais de particular importância para IBD, podem ser aclarados em estudos específicos livres de componentes patogénicos e gnotobióticos. Serão esses estudos a estabelecerem as bases fundamentais para as abordagens terapêuticas com vista ao tratamento e prevenção do aparecimento e recidivas de inflamação intestinal em indivíduos geneticamente predispostos, usando manipulações fisiológicas e não tóxicas para reparar a disbiose da IBD. (15) Em resumo, podemos apontar como perspetiva futura, a identificação dos efeitos específicos da componente genética e da dieta na função bacteriana.

Em regra, não obstante a base lógica em que acentam os tratamentos estudados, os resultados terapêuticos do uso de antibióticos, probióticos, prebióticos e do FMT nas IBDs em humanos têm sido contraditórios. Conquanto seja possível que a disbiose analisada, a absorção ampliada de produtos bacterianos e o incremento das respostas imunológicas nas IBDs sejam fenómenos secundários, é igualmente provável que as abordagens terapêuticas atuais, numa perspetiva de restabelecimento da microbiota normal, ainda careçam de aperfeiçoamento. Os tratamentos envolvidos na configuração do microbioma podem utilizar diversas estratégias para melhorar. (36) Alguns destes planos são de natureza incremental, através de terapias individualizadas assentes em micro-organismos, alicerçadas no perfil particular da microbiota intestinal do indivíduo, com a finalidade de restaurar probioticamente uma ou mais espécies microbianas ou

intensificar o crescimento seletivo de grupos de micro-organismos pouco evidentes por meio da dieta, produtos farmacêuticos ou prebióticos. Outros orientam-se para a destruição das espécies bacterianas, virais ou fúngicas pró-inflamatórias de um indivíduo, mediante seleção contra outros micro-organismos da flora através do mesmo método ou mediante o desenvolvimento de antibióticos com espectros reduzidos. Todavia, é imprescindível uma abordagem mais racional no plano da seleção de espécies microbianas probióticas nas IBDs. (36)(45) A identificação de micro-organismos benéficos ou prejudiciais na IBD pode possibilitar um tratamento personalizado de micro-organismos específicos que, em última instância, mudará o curso da doença de forma benéfica. (1) Exemplificando, os micro-organismos com evidência pré-clínica de potencial anti-inflamatório nas IBDs, como *F. prausnitzii* e certas espécies de *Clostridium* e *Bacteroides*, deverão fazer parte de futuras terapias probióticas. (36) Sem embargo, necessitam ser desenvolvidas novas abordagens inovadoras para a terapêutica sustentada em micro-organismos, abarcando a administração de produtos bacterianos sintéticos em vez de seres viáveis, utilizando bactérias recombinantes como vetores para o fornecimento de moléculas anti-inflamatórias diretamente no ponto alvo e usando bacteriófagos em terapias direcionadas a vírus e desta forma melhorar os sintomas associados à IBD. (1)(36) Assim, é indispensável que se realizem mais estudos sobre o impacto das terapias existentes e apostar na individualização da terapêutica.

Os estudos da IBD, por força da complexidade do microbioma humano, enquanto sistema de interação dinâmico, foi recolhida escassa informação para relacionar a patogénese num hospedeiro humano, micro-organismos individuais e alterações no metabolismo e funções microbianas. O que nos sugere, desde logo, a importância de uma abordagem mais multifacetada para o estudo do microbioma na IBD. (46)

É fundamental para as novas investigações, que existam mais pesquisas longitudinais de doentes antes, durante e após o tratamento, bem como ensaios clínicos em grande escala que ponderem tanto a heterogeneidade microbiana quanto a genética, necessitarão de ser realizados e devem ser tratados de forma multifacetada. Combinar diferentes estudos de coorte promove uma abordagem para aumentar o tamanho das amostras. No entanto, o tipo de amostra, coleção e extração podem inserir dissemelhanças na composição microbiana, o que, malgradamente, torna mais difícil combinar conjuntos de dados produzidos sob diferentes protocolos. A standardização de protocolos experimentais

entre as coortes será fundamental para conservar o poder estatístico para a identificação dos efeitos biológicos verdadeiros nos conjuntos de dados dos microbiomas. Isso imporá esforços crescentes para estandardizar a coleta de amostras de doentes e as suas informações clínicas. A busca de um regime holístico obrigará a uma solução para a medição simultânea do estado do hospedeiro, do microbioma e da sinalização multidirecional entre eles. Embora hajam sido expostas soluções para o isolamento sequencial de metabolitos, RNA, DNA e proteínas da uma única amostra, a preparação de uma solução que possa ser facilmente implantada como um kit de auto-amostragem para doentes carecerá de maior exploração. Estes desafios foram tratados com recurso a outras tecnologias, como por exemplo, no uso de *microarrays* como ferramenta para a deteção de biomarcadores em aplicações clínicas, o que levou à fixação de um consórcio com a finalidade de estabelecer padrões e medidas de qualidade. Esses esforços são agora também iniciados no espaço de microbiologia com relevância ambiental e clínica, e poderia eventualmente permitir-nos combinar várias coortes grandes bem caracterizadas sem o desafio dos vieses inseridos nos estudos. (46) Em conclusão, enquanto perspectiva futura, deverá haver uma mudança na forma da realização dos estudos para uma vertente multifacetada, holística e padronizada, orientada para à obtenção de resultados mais conclusivos.

A capacidade do microbioma intestinal, enquanto biomarcador para a saúde do hospedeiro na IBD ainda não foi totalmente explorada. Os estudos vindouros terão como escopo identificar, por um lado, o papel potencial do microbioma intestinal no aparecimento da doença, por outro lado, determinar se a composição microbiana vaticina o risco subsequente de recidivas e, por fim, analisar se a flora prevê a resposta à terapia. A identificação de um padrão microbiano que incuta uma defesa imunológica e uma melhoria na inflamação seria uma expectativa, bem-vinda, para uma nova abordagem diagnóstica e terapêutica para a gestão das IBDs. (45)(46)

9. Discussão

A IBD tem sido alvo de numerosos estudos em torno da composição da microbiota, sempre com vista a apurar a sua influência na doença, ainda que na maior parte dos

casos, a sua maior atenção seja dirigida apenas aos níveis taxonômicos superiores das bactérias. Dessa forma, um maior foco nos níveis taxonômicos mais baixos (família, género, espécie) poderá melhorar a nossa compreensão da influência da microbiota na patogénese da IBD. A compreensão das funções e maior elucidação dos mecanismos inerentes mais relevantes, devido à relação complexa entre a microbiota, o hospedeiro e os fatores ambientais, apresentam-se como um grande desafio. A perceção dos parâmetros funcionais que regem estas relações, provavelmente será mais importante que a caracterização fenotípica da microbiota. Uma maior perceção da relação entre a composição da microbiota e as funções associadas poderá revelar se o microbioma tem um papel na etiologia ou se contribui para a iniciação e/ou progressão da IBD. (6)

Os estudos dos tratamentos apresentados decorreram, maioritariamente, em curtos intervalos de tempo, são compostos por diferentes tipos de amostras e em reduzido número. Vários estudos que incidiam no efeito da dieta, dos probióticos, dos prebióticos e do FMT no microbioma viram as alterações instituídas reverterem ao estado inicial passado algum tempo do fim da intervenção, sugerindo que, para que estas intervenções tenham sucesso, ter-se-ão de realizar estudos mais prolongados. (1) O número reduzido de amostras foi uma constante na maioria dos estudos, impedindo tirar conclusões bem fundamentadas. Uma forma de resolver esta situação será, no futuro, combinar vários estudos coorte.(46) Para além disso, o tipo de amostras utilizadas foi distinto nos vários ensaios, sendo que a maioria dos estudos foi realizada com recurso a fezes, devido, principalmente, à maior facilidade da sua coleta. As fezes fornecem, principalmente, informação acerca da atividade dos micro-organismos, enquanto que as biópsias da mucosa descrevem a atividade do hospedeiro humano. Para além disso, as fezes são caracterizadas por uma expansão de *Firmicutes* relativamente a *Proteobacterias* e *Bacteroidetes* na superfície da mucosa, enquanto que as biópsias têm uma composição mais variável devido ao local de onde são retiradas, a qual é influenciada pelas diferenças no pH, densidade microbiana, distinção entre os tecidos do intestino delgado e grosso, entre outros fatores que ainda não estão bem caracterizados. (45) Desta feita, podemos concluir que várias medidas terão de ser tomadas para padronizar os estudos de forma a termos resultados melhor fundamentados. (1)

10. Conclusões

A IBD, onde se inclui a CD e a UC, é uma doença crónica cuja incidência tem vindo a aumentar ao longo dos anos, está associada a uma morbilidade significativa. A alteração do microbioma intestinal tem sido implicada na patogénese da IBD e vários são os estudos que têm incidido nesta matéria.

Diversos fatores genéticos e ambientais influenciam a composição do microbioma intestinal tanto como as suas funções. A componente genética predispõe à doença, porém são necessários outros fatores para a desencadear, como a dieta, a idade e a medicação. Os vários aspetos influenciam a composição e as funções do microbioma de formas e intensidades distintas, podendo levar a situações de patologia. Na IBD as funções de barreira, imunológicas, metabólicas, entre outras, estão afetadas, comprometendo a saúde do hospedeiro.

Algumas opções terapêuticas, visando a modulação do microbioma, como os prebióticos, os probióticos e o FMT, têm sido alvo de várias investigações para fins terapêuticos. Contudo, os estudos têm várias limitações e os resultados obtidos têm sido contraditórios, exigindo uma maior e melhor investigação neste tema.

No futuro, em virtude da complexidade inerente à IBD, será necessário aprofundar as investigações em torno da identificação do papel do microbioma na patogénese; da possibilidade da composição microbiana predizer o risco de IBD e da capacidade da flora luminal antever a resposta à terapia. Dessa forma, torna-se indispensável tomar medidas para melhorar a qualidade dos estudos através de uma posição multifacetada, holística e padronizada.

11. Referências bibliográficas

1. Berg D, Clemente JC, Colombel J-F. Can inflammatory bowel disease be permanently treated with short-term interventions on the microbiome? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015 Feb 10;1–15. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/17474124.2015.1013031>
2. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 May;140(6):1785–1794.e4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.055>
3. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Aug 3;50(8):942–51. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00365521.2015.1014407>
4. Vindigni SM, Zisman TL, Suskind DL, Damman CJ. The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: a tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions. *Therap Adv Gastroenterol* [Internet]. 2016 Jul 22;9(4):606–25. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756283X16644242>
5. Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. Microbiome Survey of the Inflamed and Noninflamed Gut at Different Compartments Within the Gastrointestinal Tract of Inflammatory Bowel Disease Patients. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2016 Apr;22(4):817–25. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-201604000-00006>
6. Li J, Butcher J, Mack D, Stintzi A. Functional Impacts of the Intestinal Microbiome in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2015 Jan;21(1):139–53. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-201501000-00015>
7. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* [Internet]. 2012 Sep 12;489(7415):220–30. Available from: <http://www.nature.com/nature/journal/v489/n7415/abs/nature11550.html>
8. Eckburg PB. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* (80-) [Internet]. 2005 Jun 10;308(5728):1635–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1110591>
9. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BMR, Spiller RC, Vanner S, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* [Internet]. 2013 Jan;62(1):159–76. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2012-302167>
10. Albenberg LG, Lewis JD, Wu GD. Food and the gut microbiota in inflammatory bowel diseases. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. 2012 Jul;28(4):314–20. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001574-201207000-00005>
11. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2010 Aug 17;107(33):14691–6.

Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005963107>

12. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* [Internet]. 2012 May 9;486(7402):222–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/nature11053>
13. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* (80-) [Internet]. 2011 Oct 7;334(6052):105–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1208344>
14. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* [Internet]. 2013 Dec 11;505(7484):559–63. Available from: <http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/nature12820>
15. Sartor RB. Genetics and Environmental Interactions Shape the Intestinal Microbiome to Promote Inflammatory Bowel Disease Versus Mucosal Homeostasis. *Gastroenterology* [Internet]. 2010 Dec;139(6):1816–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508510015246>
16. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* [Internet]. 2009 Jan 22;457(7228):480–4. Available from: <http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/nature07540>
17. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJP, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2002 Apr;122(4):867–74. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508502056779>
18. Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* [Internet]. 2010 Nov 1;156(11):3216–23. Available from: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.040618-0>
19. Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Järnerot G, Engstrand L, et al. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2009 May;15(5):653–60. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-200905000-00007>
20. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward D V, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* [Internet]. 2012;13(9):R79. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2012-13-9-r79>
21. Jandhyala SM. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015;21(29):8787. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i29/8787.htm>
22. Brüssow H. Microbiota and healthy ageing: observational and nutritional intervention studies. *Microb Biotechnol* [Internet]. 2013 Jul;6(4):326–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12048>
23. Boerner BP, Sarvetnick NE. Type 1 diabetes: role of intestinal microbiome in humans and mice. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2011 Dec;1243(1):103–18. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2011.06340.x>

24. Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009 Apr 7;106(14):5859–64. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0901529106>
25. Vermeiren J, den Abbeele P, Laukens D, Vigsnaes LK, Vos M, Boon N, et al. Decreased colonization of fecal *Clostridium coccoides*/*Eubacterium rectale* species from ulcerative colitis patients in an in vitro dynamic gut model with mucin environment. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2012 Mar;79(3):685–96. Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2011.01252.x>
26. Knights D, Lassen KG, Xavier RJ. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut* [Internet]. 2013 Oct;62(10):1505–10. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2012-303954>
27. Wen Z, Fiocchi C. Inflammatory Bowel Disease: Autoimmune or Immune-mediated Pathogenesis? *Clin Dev Immunol* [Internet]. 2004;11(3–4):195–204. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2004/839572/abs/>
28. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* [Internet]. 2007 Jul 26;448(7152):427–34. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature06005>
29. Abraham C, Medzhitov R. Interactions Between the Host Innate Immune System and Microbes in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 May;140(6):1729–37. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508511001624>
30. Scott MG, Nahm MH, Macke K, Nash GS, Bertovich MJ, MacDermott RP. Spontaneous secretion of IgG subclasses by intestinal mononuclear cells: differences between ulcerative colitis, Crohn's disease, and controls. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1986;66(1):209–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1542645&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
31. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 Apr 7;15(5):329–329. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3848>
32. Bücker R, Schulz E, Günzel D, Bojarski C, Lee I-FM, John LJ, et al. α -Haemolysin of *Escherichia coli* in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon. *Gut* [Internet]. 2014 Dec;63(12):1893–901. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2013-306099>
33. Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, Mitsuyama K, Fujiyama Y, Benno Y. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2007 Aug;13(8):955–62. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-200708000-00003>
34. Araya M, Gopal P, Lindgren SE, Lodi R, Oliver G, Saxelin M-(Liisa), et al. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria [Internet]. FAO & WHO. 2001. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Health+and+Nutritio>

nal+Properties+of+Probiotics+in+Food+including+Powder+Milk+with+Live+Lactic+Acid+Bacteria#2%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Health+and+Nutrit

35. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, et al. Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutr* [Internet]. 2013;2013:1–7. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/481651/>
36. Hansen JJ, Sartor RB. Therapeutic Manipulation of the Microbiome in IBD: Current Results and Future Approaches. *Curr Treat Options Gastroenterol* [Internet]. 2015 Mar 18;13(1):105–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11938-014-0042-7>
37. Caprilli R. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut* [Internet]. 2006 Mar 1;55(suppl_1):i36–58. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2005.081950c>
38. Wu GD, Bushmanc FD, Lewis JD. Diet, the human gut microbiota, and IBD. *Anaerobe* [Internet]. 2013 Dec;24:117–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.011>
39. Lionetti P, Callegari ML, Ferrari S, Cavicchi MC, Pozzi E, de Martino M, et al. Enteral Nutrition and Microflora in Pediatric Crohn's Disease. *J Parenter Enter Nutr* [Internet]. 2005 Jul 11;29(4_suppl):S173–8. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/01486071050290S4S173>
40. Shiga H, Kajiura T, Shinozaki J, Takagi S, Kinouchi Y, Takahashi S, et al. Changes of faecal microbiota in patients with Crohn's disease treated with an elemental diet and total parenteral nutrition. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2012 Sep;44(9):736–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1590865812001545>
41. Kakodkar S, Farooqui AJ, Mikolaitis SL, Mutlu EA. The Specific Carbohydrate Diet for Inflammatory Bowel Disease: A Case Series. *J Acad Nutr Diet* [Internet]. 2015 Aug;115(8):1226–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212267215005043>
42. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Jan 31;368(5):407–15. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1205037>
43. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Bengmark S, Scholze J, Doerffel Y. Bacterial Biofilm Suppression with Antibiotics for Ulcerative and Indeterminate Colitis: Consequences of Aggressive Treatment. *Arch Med Res* [Internet]. 2008 Feb;39(2):198–204. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0188440907003049>
44. Koido S, Ohkusa T, Kajiura T, Shinozaki J, Suzuki M, Saito K, et al. Long-Term Alteration of Intestinal Microbiota in Patients with Ulcerative Colitis by Antibiotic Combination Therapy. *Cominelli F, editor. PLoS One* [Internet]. 2014 Jan 29;9(1):e86702. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0086702>
45. Huttenhower C, Kostic AD, Xavier RJ. Inflammatory Bowel Disease as a Model for Translating the Microbiome. *Immunity* [Internet]. 2014 Jun;40(6):843–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761314001939>
46. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology* [Internet]. 2014 May;146(6):1489–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.009>